

УДК 581.143

© 1990 г.

О.В. МОСКАЛЕВА, Н.Н. КАРАВАЙКО

ДИНАМИКА ЭНДОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ В РАЗВИВАЮЩИХСЯ ПРОРОСТКАХ КУКУРУЗЫ

*Биолого-почвенный факультет Ленинградского государственного университета
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Академии наук СССР*

Методом иммуноферментного анализа определяли содержание ИУК, АБК и цитокининов в органах проростков кукурузы (*Zea mays* L.) в возрасте от 2 до 5 сут. В проростках всех возрастов максимальное содержание ИУК наблюдалось в апикальной части coleoptilya, характеризующегося активным ростом растяжением. Делящиеся клетки и клетки, закончившие рост, отличались пониженным уровнем ИУК. Замедление роста coleoptilya и мезокотилья сопровождалось повышением в них уровня АБК. Содержание цитокининов коррелировало с интенсивностью деления клеток. Сделан вывод, что регуляция деления и растяжения клеток в органах проростков кукурузы осуществляется путем изменения специфического соотношения фитогормонов в каждом органе.

Кукуруза — прорастание — фитогормоны — иммуноферментный метод.

Рост органов растений в большой степени определяется содержанием фитогормонов в растущей ткани: их притоком из мест синтеза, разрушением или конъюгацией гормона. Однако непосредственная связь содержания фитогормонов с интенсивностью ростовых процессов показана лишь для отдельных случаев. Так, в работе Вайлера с сопр. [1] имеются данные о корреляции между содержанием ИУК и АБК в различных зонах coleoptilya кукурузы и овса и способностью этих зон к росту растяжением. Данные Пиле и Соги [2] говорят о связи скорости роста корня кукурузы с содержанием в нем ИУК и АБК.

Прорастающие семена растений характеризуются высоким уровнем эндогенных фитогормонов. В зародыше кукурузы количество свободной ИУК от момента набухания до 48 ч прорастания возрастает в 50 раз [3]. Содержание АБК в осевых органах прорастающих семян гороха сначала несколько снижается, а затем возрастает [4]. Значительные количества цитокининов и гиббереллинов обнаруживаются в зародыше пшеницы [5]. Однако распределение фитогормонов по органам проростка в процессе его развития практически не изучено, несмотря на то, что подобные данные весьма важны для понимания механизмов регуляции роста органов развивающегося проростка.

Во время развития проростков кукурузы происходят значительные изменения в скорости роста отдельных органов [6]. Одновременно изменяется интенсивность деления клеток в меристемах корня и побега [7] и чувствительность отдельных органов к экзогенным фитогормонам [8]. Это может быть связано как с изменением эндогенного содержания фитогормонов в органах проростка в процессе его развития, так и с компетентностью клеток различных органов, поскольку клетки, находящиеся на разных фазах развития (делящиеся, растягивающиеся, дифференцированные) по-разному реагируют на фитогормоны [9].

В связи со сказанным целью данной работы было определение содержания эндогенных фитогормонов (ИУК, АБК и цитокининов) в органах проростков кукурузы в возрасте от 2 до 5 сут, различающихся по интенсивности роста и реакции на экзогенные фитогормоны.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили этилированные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Одесская 80. После 2-часового замачивания в теплой водопроводной воде зерновки 2 сут проращивали между слоями влажной фильтровальной бумаги в эмалированных кюветах в темноте при 27°. Далее проростки выращивали без фильтровальной бумаги на водопроводной воде в тех же условиях. Содержание экстрагируемых эндогенных фитогормонов определяли в зонах проростков, изображенных на рис. 1; размеры зон приведены в таблице. Диффузионную ИУК определяли в отрезках побега проростка (см. рис. 3), соответствующих по расположению и размерам зонам на рис. 1.

Размеры зон проростков, изображенных на рис. 1 (мм)

Зона	Возраст, сут			
	2	3	4	5
А	2	5	5	5
Б	3	5	10	10
В	2	5	5	5
Г	2	5	5	5
Д	3	5	10	10
Е	20	20	20	20

Экстракцию фитогормонов проводили следующим образом. Навеску растительного материала (0,5–1,5 г) растирали на холоде в жидком азоте. Тщательно растертый материал переносили в центрифужные пробирки, заливали 10-кратным объемом холодного 96%-ного этанола с добавлением диэтилдитиокарбамата натрия ($400 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) в качестве антиоксиданта и 10% от навески растительного материала Polyclar AT ("Serva", ФРГ) для сорбции фенолов. Экстракцию проводили в течение ночи на холоде. После 20-минутного центрифугирования при 8000 g на холоде супернатант сливали, а осадок трижды промывали небольшим количеством холодного 80%-ного этанола с последующим центрифугированием в тех же условиях. Супернатанты объединяли и упаривали на ротационном испарителе в вакууме при 40°. Водную фазу подщелачивали 1%-ным раствором бикарбоната натрия до pH 7–8 и встряхивали с 2-кратным объемом очищенного от перекисей диэтилового эфира. Эфирную фазу отбрасывали, а водную подкисляли HCl до pH 2–3, после чего из нее экстрагировали ИУК и АБК 2-кратным объемом диэтилового эфира. Водную фазу, содержащую цитокинины, подщелачивали 40%-ным КОН до pH 8 и экстрагировали цитокинины водонасыщенным бутанолом; бутанольную фракцию упаривали досуха.

Диффузионную ИУК определяли по диффузии ИУК из отрезков побега в 0,9%-ный агар в темноте при 25° в течение 1,5–2 ч. ИУК из агара экстрагировали диэтиловым эфиром, очищенным от перекисей, в течение ночи на холоде.

Метилирование ИУК и АБК осуществляли диазометаном, синтезированным из нитрозометилмочевины. В эфирный экстракт, содержащий ИУК и АБК, добавляли эфирный раствор диазометана до появления стабильной слабо-желтой окраски, после чего эфир упаривали досуха.

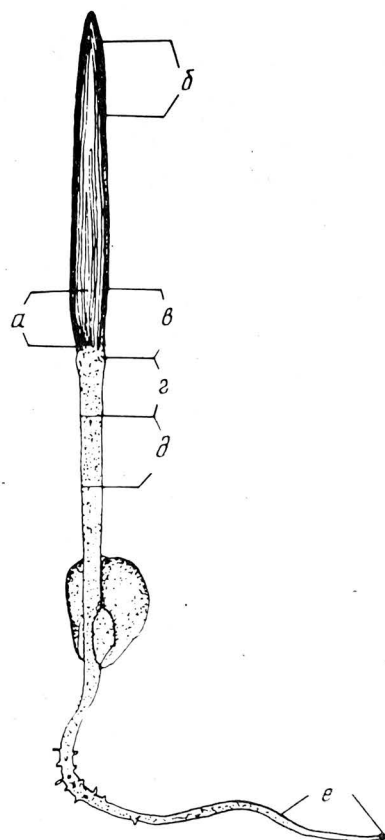
Сухой остаток, содержащий фитогормоны, перерастворяли в 50–100 мкл 80%-ного этанола и добавляли определенное количество воды так, чтобы конечная концентрация спирта не превышала 5%. В полученных препаратах определяли содержание ИУК, АБК и цитокининов методом твердофазного иммуноферментного анализа [10–12]. Постановку опытов проводили следующим образом. В лунки планшета для иммунологических реакций разливали по 200 мкл конъюгата гормона с овальбумином, разведенного в 0,05 М карбонатном буфере, pH 9,7, и выдерживали для сенсибилизации 3 ч

при 37°. Разведение исходного конъюгата АБК и зеатинрибозида было 1/6000, ИУК — 1/1000. После сенсибилизации планшеты промывали твин-фосфатным солевым буфером, рН 7,3.

В лунки сенсибилизированных планшетов разливали по 100 мкл растительных экстрактов или стандартных растворов гормонов и 100 мкл сыворотки, соответственно разведенной на том же буфере с добавлением 0,5% овальбумина для предотвращения неспецифического связывания. Через 1 ч инкубации при 37° происходило связывание антител с гормонами, находящимися в растворе и иммобилизованными на полистироле. После промывки планшетов буфером в лунки разливали по 200 мкл противокроличьих ослиных иммуноглобулинов, меченных пероксидазой, разведенных в ТФСБ

Рис. 1. Схема зон проростков кукурузы, использованных для анализа фито-гормонов

а — лист, б — апикальная часть coleoptily, в — базальная часть coleoptily, г — апикальная часть мезокотили, д — базальная часть мезокотили, е — корень (то же на рис. 2)



с 0,5% овальбумина. После 1 ч инкубации при 37° планшеты вновь промывали буфером и дистиллированной водой. Активность пероксидазы определяли с ортофенилендиаминном и H_2O_2 . Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 5 н. серной кислоты. Измерение оптической плотности проводили при 492 нм на Titertek-Multiscan ("Flow", Великобритания).

В работе использовали сыворотки против АБК и зеатинрибозида (ИФР АН СССР) и сыворотку против ИУК (Институт биологии Башкирского филиала Уральского отделения АН СССР). В качестве стандартных растворов гормонов использовали растворы зеатинрибозида ("Sigma", США) и растворы метиловых эфиров ИУК и АБК, полученные путем метилирования диазометаном известных количеств ИУК ("Serva", ФРГ) и АБК ("Calbiochem", США).

Количество гормона в растительном экстракте определяли по калибровочной кривой. Содержание фитогормонов в растительном материале рассчитывали в пмолях на 1 г свежей массы и в пмолях на 10^6 клеток.

Количество клеток в соответствующих зонах проростков определяли с помощью счетной камеры Горяева после мацерации тканей 5%-ной уксусной кислотой в 2н. HCl при нагревании 30–40 мин на кипящей водяной бане [13].

Определения проводили в 3–4-кратной биологической и 2–3-кратной аналитической повторности. Результаты обработаны статистически, на графиках приведены средние арифметические из биологических повторностей и их среднеквадратичные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение содержания эндогенных фитогормонов в органах развивающихся проростков кукурузы показало, что уровень ИУК, АБК и цитокининов различен в разных органах и меняется с возрастом проростка. При пересчете содержания фитогормонов на 1 г свежей массы было показано, что для всех органов 2-суточных проростков характерно сравнительно низкое содержание ИУК и довольно высокое — цитокининов, кроме корня, где соотношение ИУК/цитокинины на порядок превышает такое же соотношение в органах побега (рис. 2, А—В). Такое распределение фитогормонов согласуется с нашими данными о том, что в проростках этого возраста наблюдается активное деление клеток во всех органах [7]. Содержание АБК у 2-суточных проростков максимально в основании листьев и плавно снижается по направлению от верхушки coleoptily к корню. Примерно такое же соотношение в содержании гормонов по органам характерно и для ИУК и цитокининов.

К 3-м сут содержание фитогормонов во всех органах резко изменяется. Значительно снижается содержание цитокининов, особенно в надземной части проростка. Уровень ИУК, напротив, повышается, и это повышение также наиболее выражено у надземных органов. Изменение уровня АБК происходит иначе. В листьях количество АБК резко снижается в период от 2-х до 3-х сут; и в апикальной части coleoptily, и в нижележащих зонах надземной части содержание АБК практически не изменяется, а в корне увеличивается в 2,5 раза. В дальнейшем содержание АБК в тканях остается почти без изменений, тогда как уровень ИУК в корне и основании листьев повышается еще к 4-м сут, а в остальных органах снижается. Концентрация цитокининов в корнях возрастает, в надземной части изменения менее выражены.

В целом можно отметить, что в проростках кукурузы прослеживается отчетливый градиент содержания ИУК в осевых органах. Например, у 3-суточных проростков содержание ИУК меняется от $997 \text{ пмоль} \cdot \text{г}^{-1}$ в апикальной части coleoptily до $153 \text{ пмоль} \cdot \text{г}^{-1}$ в кончике корня.

Градиент концентрации ИУК впервые был обнаружен еще Тиманном [14], и его наличие подтверждалось неоднократно в ряде исследований. В работе [15] показано, что содержание как свободной, так и связанной ИУК в coleoptily кукурузы выше, чем в мезокотильях. В верхней части мезокотилия кукурузы ИУК в 2—3 раза больше, чем в нижней [16]. Примерно такое же соотношение обнаружено и для coleoptily кукурузы [1]. Наши данные по содержанию ИУК в разных органах в основном совпадают с результатами определения ИУК в соответствующих органах проростков кукурузы, полученными другими авторами [1, 2, 15]. Следует отметить, что при прекращении роста coleoptily происходит резкое снижение содержания в нем ИУК и функция синтеза этого гормона, вероятно, переходит на этом этапе развития от верхушки coleoptily к апикальной меристеме стебля. Косвенным подтверждением этого предположения могут служить результаты наших опытов по определению диффузионной ИУК в побеге развивающегося проростка кукурузы. Анализ диффузии ИУК из отрезков побега показал, что у 2-суточных проростков из отрезков coleoptily разной длины она достоверно не различается (рис. 3). Это может быть результатом низкого уровня метаболизации гормона в процессе транспорта, однако можно выдвинуть и предположение о том, что в молодом coleoptile почти все клетки способны синтезировать ИУК.

Диффузия ИУК из апикальной меристемы стебля и развивающихся листьев в 3—4 раза меньше, чем из отрезков, содержащих coleoptile. Позже, на 3—4-е сут, максимальное количество диффузионной ИУК выделяет верхушка coleoptily; по направлению к основанию побега диффузия ИУК снижается. Аналогичное распределение диффузионной ИУК было получено и другими авторами [1, 15]. На 5-е сут, когда рост coleoptily прекращается, диффузия ИУК из верхушки coleoptily резко снижается, что, вероятно, может говорить о прекращении синтеза ИУК верхушкой coleoptily, которая, как считают, является ответственной за синтез этого гормона у проростков злаковых. Снижение уровня диффузии ИУК из coleoptily сопровождается постепенным нарастанием диффузии ИУК из молодых листьев. Это наряду с резким нарастанием уровня

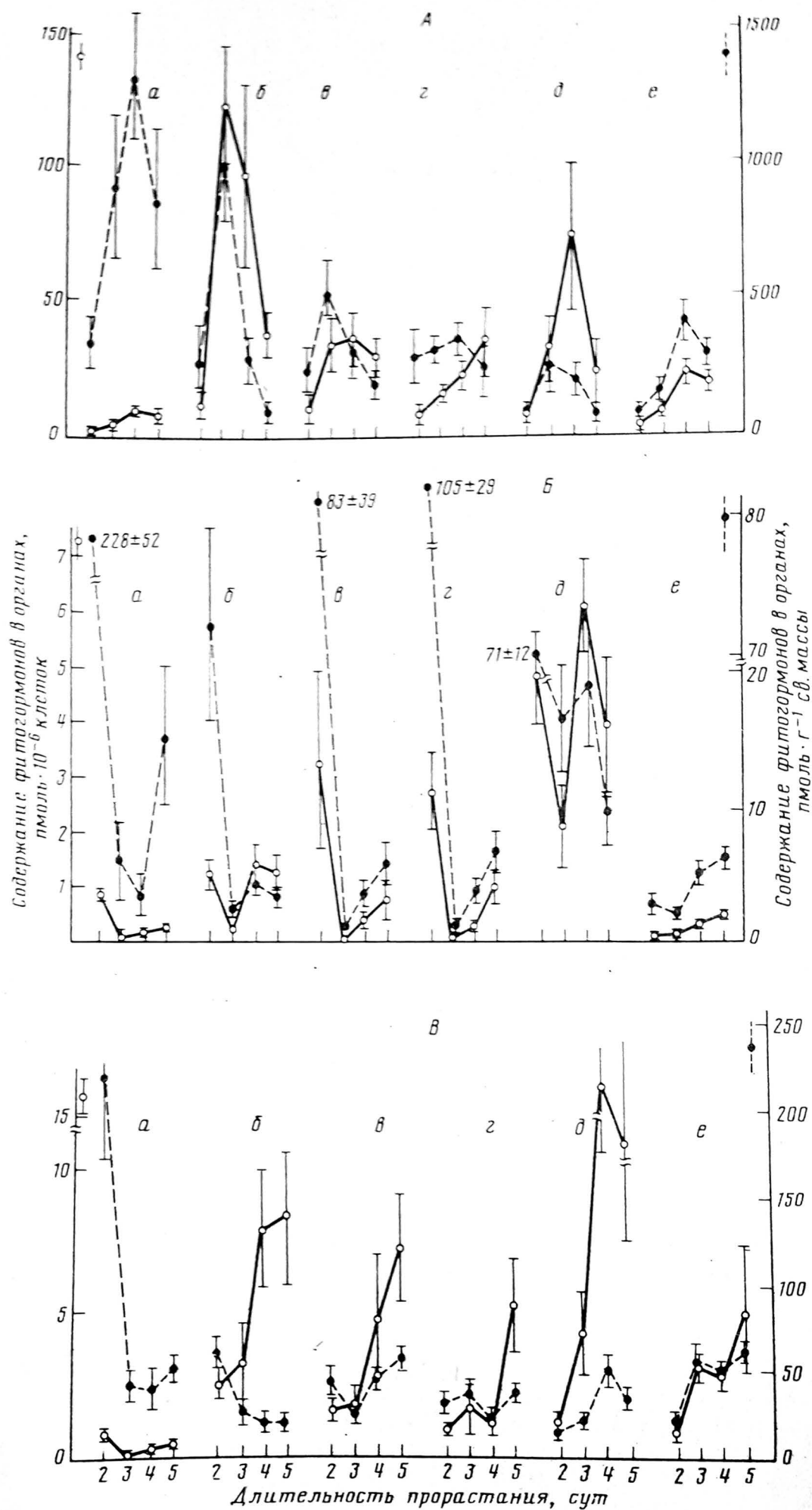


Рис. 2. Содержание ИУК (А), цитокининов (Б) и АБК (В) в органах развивающихся проростков кукурузы

Сплошные линии — на 10^6 клеток и прерывистые — на 1 г свежей массы

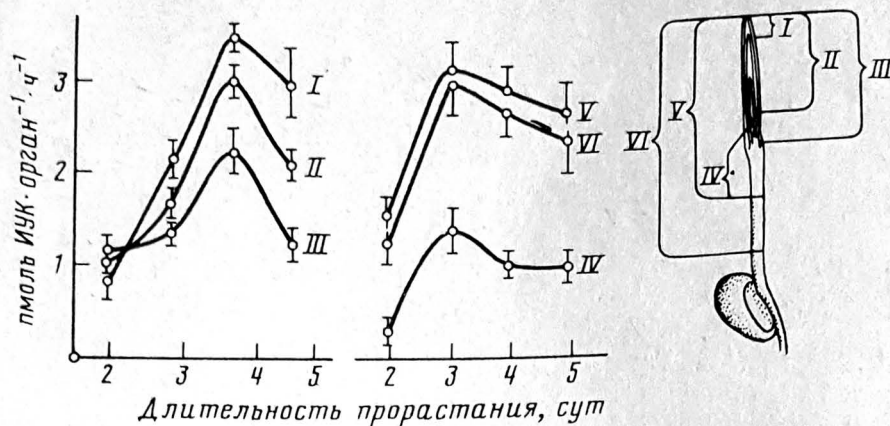


Рис. 3. Уровень диффузионной ИУК в органах побега проростков кукурузы
Диффузия ИУК в агар в темноте при 25° 1,5 ч. I–VI – кривые изменения уровня диффузионной ИУК из отрезков, отмеченных на схеме

экстрагируемой ИУК в листьях в этот период и может служить подтверждением нашего предположения о переходе функции синтеза ИУК от верхушки coleoptily к апексу побега, что является характерной для взрослого растения чертой. Таким образом, в активно растущих органах проростка градиент содержания как экстрагируемой, так и диффузионной ИУК коррелирует с ростовой активностью отдельных зон и направлен противоположно градиенту чувствительности к экзогенному ИУК [8].

Наши данные по содержанию в органах проростка кукурузы цитокининов и АБК также в целом согласуются с имеющимися в литературе [1, 2]. Содержание цитокининов в надземных органах повышается по направлению от апекса к основанию, чем может объясняться большая чувствительность coleoptiley к экзогенному цитокинину [8]. Сходную зависимость влияния экзогенного гормона от его эндогенного содержания можно отметить и для АБК: мезокотили кукурузы весьма слабо реагируют на обработку экзогенной АБК, и в то же время эндогенного гормона в них больше, чем в coleoptilyах.

Если при расчете содержания гормона на 1 г свежей массы прослеживается связь с ростовой активностью ткани в целом, то при определении количества гормона в клетке отдельного органа можно выявить закономерности, отражающие реальные физиологические особенности этих клеток. Так, в зонах с интенсивным ростом растяжением содержание ИУК в клетках значительно выше, чем там, где происходит деление клеток, а именно в основании листьев и участках coleoptilyа и мезокотilyа, прилежащих к узлу (рис. 2, а). Клетки тех участков, где происходит переход от деления клеток к их растяжению или где рост растяжением уже заканчивается (апикальные участки 2- и 5-суточных проростков соответственно) характеризуются промежуточными значениями содержания ИУК в клетках. Можно отметить, что там, где происходит исключительно рост растяжением без одновременного деления клеток, происходит параллельное изменение содержания ИУК в клетках и интенсивности роста отрезков органов. В тех зонах побега, где происходит деление клеток, содержание экстрагируемой ИУК в клетках отрицательно коррелирует с митотическим индексом в соответствующих участках ($r = -0,92 \dots -0,98$).

При анализе изменения содержания АБК и цитокининов также можно проследить тесную связь с ростовыми процессами (рис. 2, б, в). Так, изменение содержания цитокининов во всех органах коррелирует с интенсивностью деления клеток в меристематических зонах этих органов ($r = +0,5,6 \dots +0,98$). В корне изменения скорости роста, митотической активности и содержания цитокининов происходят параллельно, что может свидетельствовать в пользу того, что в проростках образование цитокининов осуществляется в растущих зонах корня.

Интенсивность роста растяжением оказывается тесно связанной не только с содержанием ИУК в растущих клетках, но и с содержанием в них АБК. В период максималь-

ного роста растяжением (3-и сут) содержание АБК низкое, оно резко увеличивается к моменту замедления и прекращения роста coleoptилей и мезокотилей (4–5-е сут) (рис. 2, в). Сходную картину изменения содержания ИУК и АБК в процессе развития coleoptилей овса наблюдал Вайлер с сотр. [1].

Полученные нами данные по содержанию фитогормонов в органах проростков кукурузы относятся к свободным формам гормонов. При количественном анализе фитогормонов необходимо учитывать, какие конкретно формы фитогормонов могут быть определены при использованных методах экстракции и оценки количественного содержания, поскольку изменение содержания активных форм фитогормонов может происходить не только за счет их синтеза *de novo*, но и вследствие гидролиза связанных форм, или напротив, инактивации свободных гормонов путем образования их неактивных связанных форм или разрушения. Особенно это важно при применении иммунологических методов определения фитогормонов с использованием поликлональных антител. В нашей работе при анализе цитокининов сыворотки содержали антитела к зеатину, способные определять как зеатин, так и зеатинрибозид, но слабо реагирующие с такими формами цитокининов, как риботиды, гликозиды, изопентиладенин [12], и потому полученные нами данные характеризуют суммарное содержание зеатина и зеатинрибозида, являющихся активными формами цитокининов, в связи с чем их суммарное содержание может использоваться для физиологической характеристики растительной ткани. Связь гормона с белком при получении конъюгатов ИУК и АБК, использованных для выработки антител к этим гормонам, осуществлялась по карбоксильной группе (C_1), т.е. подобные антитела могут реагировать с гормонами, находящимися как в свободной, так и в связанной форме [10, 11]. Однако при выделении ИУК и АБК методом кислотно-щелочной переэкстракции в эфирную фазу должны переходить только свободные формы гормонов и для выделения связанных форм необходимо проводить их гидролиз. В нашей работе гидролиз связанных форм ИУК и АБК не проводился, т.е. полученные нами данные по количественному содержанию ИУК и АБК также характеризуют уровень активных, свободных форм этих фитогормонов.

Таким образом, сопоставляя все изложенное с результатами, полученными при изучении роста и митотической активности в органах проростков кукурузы, можно заключить, что для каждого этапа роста органов характерно специфическое соотношение фитогормонов. Интенсивное деление клеток сопряжено с высоким содержанием цитокининов и сравнительно низким — ИУК и АБК. При переходе клеток к растяжению происходит резкое снижение уровня цитокининов с одновременным повышением содержания ИУК. При низком содержании в клетках АБК и цитокининов и высоком — ИУК клетки характеризуются усиленным ростом растяжением, торможение которого связано с накоплением АБК и снижением уровня ИУК в клетках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weiler E.W., Jourdan P.S., Conrad W. Levels of indole-3-acetic acid in intact and decapitated coleoptiles as determined by a specific and highly sensitive solid-phase immunoassay // *Planta*. 1981. V. 153. № 5. P. 561.
2. Pilet P.E., Saugy M. Effect on root growth of endogenous and applied IAA and ABA // *Plant Physiol.* 1987. V. 53. № 1. P. 33.
3. Беккер А.М., Гуревич Л.С., Шупарев С.М. Изучение динамики содержания индолилуксусной кислоты в отдельных частях прорастающих зерновок кукурузы с помощью высокочувствительного флуоресцентного метода — Деп. в ВИНТИ 23.02.81, № 840–81 Деп.
4. Обручева Н.В., Зембднер Г., Дате В. Эндогенная абсцизовая кислота в прорастающих семенах гороха // Докл. АН СССР. 1985. Т. 280. № 1. С. 254.
5. Thomas T.H., Khan A.A., O'Toole D.F. The location of cytokinins and gibberellins in wheat seeds // *Physiol. plant.* 1978. V. 42. № 1. P. 61.
6. Москалева О.В., Полевой В.В. Влияние фитогормонов на рост проростков кукурузы // Вестник ЛГУ. 1985. Вып. 2. № 10. С. 84.
7. Москалева О.В. Влияние фитогормонов на митотическую активность органов проростков кукурузы // Вестник ЛГУ. 1987. Вып. 2. № 10. С. 118.
8. Москалева О.В., Полевой В.В. Действие фитогормонов на рост изолированных органов пророст-

- ков кукурузы в зависимости от их возраста // Физиология и биохимия культ. растений. 1989. Т. 21. № 3. С. 248.
9. Гудков И.Н. Действие фитогормонов на продолжительность митотического цикла в клетках меристем // Регуляция клеточного цикла растений. Киев: Наук. думка. 1985. С. 6.
 10. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И. и др. Иммуноферментное определение индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиология растений. 1986. Т. 33. Вып. 6. С. 1221.
 11. Weiler E.W., Eberle J., Martens R. et al. Antisera- and monoclonal antibody-based immunoassay of plant hormones // Soc. for exp. biol. Seminar ser., 29. Immunology in plant science. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1986. P. 27.
 12. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Каравайко Н.Н. и др. Иммуноферментная тест-система для определения цитокининов // Физиология растений. 1990. Т. 37. Вып. 1. С. 193.
 13. Wright S.T.C. Growth and cellular differentiation in the wheat coleoptile. I. Estimation of cell number, cell volume and certain nitrogenous constituents // J. Exp. Bot. 1961. V. 12. № 35. P. 303.
 14. Thimann K.W. Studies of growth hormones of plants. VI. The distribution of the growth substances in plant tissue // J. Gen. Physiol. 1934. V. 18. № 1. P. 23.
 15. Iino M., Carr D. Sources of free IAA in the mesocotyl of etiolated maize seedlings // Plant Physiol. 1982. V. 69. № 5. P. 1109.
 16. Pengelly W.L., Hall P.J., Schulze A., Bandurski R.S. Distribution of free and ester indole-3-acetic acid in the cortex and stele of the *Zea mays* mesocotyl // Plant Physiol. 1982. V. 69. № 6. P. 1304.

Поступила в редакцию
17.V.1989

после доработки
5. IV.1990

O.V. MOSKALEVA, N.N. KARAVAIKO

STUDIES OF ENDOGENOUS PHYTOHORMONES IN DEVELOPING MAIZE SEEDLINGS

*Leningrad State University
K.A. Timiriazov Institute of Plant Physiology,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The content of indoleacetic acid (IAA), abscisic acid (ABA) and cytokinins was followed with immuno-enzyme technique in the organs of maize (*Zea mays* L.) seedlings at the age between 2 and 5 days. The maximal IAA level, irrespective of plant age, was observed in coleoptile tips characterized by active elongation. Dividing cells and growth-completed cells showed lower IAA level. Delays in coleoptile and mesocotyl growth was accompanied by increased ABA levels in those organs. The cytokinin content correlated with the rate of cell division. It is concluded that the regulation of cell division and elongation in maize seedling organs is carried out by changing phytohormone ratios specific to each organ.